

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

UNIDAD DE POSGRADO

**Efecto protector del extracto hidroalcoholico
atomizado de maíz morado (zea mays l.) sobre lesiones
hepáticas inducidas en ratas**

TESIS

**Para optar el Grado Académico de Magister en Farmacología con mención
en Farmacología Experimental**

AUTOR

Renan Dilton Hañari Quispe

ASESOR

Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo

Lima – Perú

2013

Dedicatoria

A Dios, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Mi madre Carmen, por darme la vida, quererme mucho, creer en mí y porque siempre me apoyaste. Mamá gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto te lo debo a ti.

A mi esposa y compañera Mayra, por su amor y comprensión, también dedico a mi hijo Dihogo quien ha sido mi mayor motivación para nunca rendirme en los estudios y poder llegar a ser un ejemplo para él.

Mis hermanos, Yaneth, José Carlos, por estar conmigo y apoyarme siempre, los quiero mucho.

Agradecimientos

AL Dr. Jorge Luis Arroyo Acevedo, Asesor de la Presente Tesis, por su infatigable apoyo, por su tiempo y preocupación, por sus sabios consejos y enseñanzas impartidas.

A los catedráticos de la UNMSM-FFB por quienes he llegado a obtener los conocimientos necesarios para poder desarrollar la tesis.

Al Señor Damián Nicolás Silva Cevallos Gerente General de Peruvian Nature S&S SAC y al Laboratorio Fitofarma EIRL, por habernos legado el extracto hidroalcohólico atomizado de *Zea maíz* (variedad morado)

INDICE

I. INTRODUCCION	1
1.1 Situación Problemática	1
1.2 Formulación del Problema	1
1.3 JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION	1
1.3.1 Justificación teórica	1
1.3.2 Justificación práctica	3
1.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	4
II. MARCO TEORICO.....	5
2.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA.....	5
2.1.1 Antecedentes Internacionales	5
2.1.2 Antecedentes Nacionales	6
2.2 BASES TEORICAS.....	7
2.2.1 Marcos Conceptuales.....	10
III. HIPOTESIS Y VARIABLES	14
3.1 HIPOTESIS GENERAL	14
3.2 HIPOTESIS ESPECÍFICA.....	14
3.3 IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES	14
3.4 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES	15
3.5. MATRIZ DE CONSISTENCIA	16
IV. METODOLOGIA	17
4.1. Materiales y Equipos.	17
4.1.1. Material biológico	17
4.1.2. Material de laboratorio	17
4.1.3. Equipos	17
4.1.4 Material farmacológico y reactivo	18
4.1.5. Preparación de los animales	18
4.2. INDUCCIÓN DE LA LESIÓN HEPÁTICA	19
4.2.1. MODELO EXPERIMENTAL.....	19
4.3. ESTUDIO HISTOLÓGICO	20
V. RESULTADOS Y DISCUSION.....	21
5.1. RESULTADOS	21
5.2. DISCUSION.....	29
CONCLUSIONES.....	33

RESUMEN

OBJETIVOS. Evaluar el efecto protector del extracto hidroalcohólico atomizado de *Zea mays* variedad morado sobre lesiones hepáticas inducidas en ratas. **Materiales y**

Métodos. Se utilizó 1 modelo experimental, siendo el agente inductor el tetracloruro de carbono administrado por vía oral. Para modelo además del CCl₄ se adiciono fenobarbital por 15 días vía oral, se utilizó sesenta ratas Holtzman divididos aleatoriamente en 6 grupos de 10 animales, uno sin lesión hepática (control negativo); los otros grupos fueron sometidos a inducción de lesión hepática por CCl₄ 0.2 mL/kg por 15 días, se consideró un grupo control positivo con suero fisiológico 2mL/kg, 3 grupos con maíz morado a 500, 1000, 2000 mg/kg respectivamente y el último con silimarina 25mg/kg. Se evaluó la evolución clínica, perfil hepático, peso corporal y la observación histológica del hígado para determinar la actividad protectora.

Tratamiento Estadístico. Las diferencias entre los grupos fueron determinados mediante análisis de varianza y las comparaciones entre grupos por las pruebas de Student y Tukey, siendo los resultados significativos con una $p < 0,05$. **Resultados.** Se ha observado la reducción del 60% de la lesión hepática, evidenciado con menor daño del hepatocito al estudio histológico y con una reducción del 83% de MDA como indicador del marcador de stress oxidativo. **Conclusiones.** En condiciones experimentales, el consumo crónico del extracto hidroalcohólico atomizado de maíz morado disminuye las lesiones hepáticas en ratas.

Palabras clave: *Zea mays* L, maíz morado, lesión hepática, efecto protector.

ABSTRACT

OBJECTIVES. Evaluate the protective effect of the hydroalcoholic extract of *Zea mays* variety atomized purple on induced liver injury in rats. **Materials and Methods.** 1 model was used experimentally as the inducing agent carbon tetrachloride administered orally. For CCl₄ model was added in addition to phenobarbital for 15 days orally, was used sixty Holtzman rats randomly divided into 6 groups of 10 animals, one without liver injury (negative control), the other groups were subjected to liver injury induced by CCl₄ 0.2 mL / kg for 15 days, was seen as a positive control group with saline 2mL/kg, purple corn 3 groups with 500, 1000, 2000 mg / kg respectively, and the latter with 25mg/kg silymarin. We evaluated the clinical course, liver function, body weight and liver histological observation to determine the protective activity. **Statistical Treatment.** Differences between groups were determined by analysis of variance and comparisons between groups by the Student and Tukey tests, and the results are significant at $p < 0.05$. **Results.** Was observed 60% reduction of liver injury, with less damage evidenced by histological hepatocyte and a 83% reduction of MDA as an indicator of oxidative stress marker. **Conclusions.** Under experimental conditions, chronic consumption of hydroalcoholic extract of purple corn atomized decreases liver injury in rats.

Keywords: *Zea mays* L, purple corn, liver damage, protective effect.

I. INTRODUCCION

1.1 Situación Problemática

La cirrosis hepática es uno de los principales problemas de salud en el mundo, debido a su alta morbilidad y mortalidad. Las tasas de defunción más elevadas se registran en Moldavia (91 por 100 000 habitantes) y Hungría (85 por 100 000), mientras que las cifras más bajas, entre 3 y 5 por 100 000 habitantes, corresponden a Irlanda, Colombia, Holanda, Singapur, Israel y Noruega. En algunos países de América Latina, como Chile y México, la cirrosis hepática ocupa entre el 50 y 60 lugar como causa de muerte general. En un estudio de carga enfermedad en el Perú, en el año 2004, los años de vida saludables perdidos (AVISA) por cirrosis fue de 76 510 años entre hombres y mujeres de personas mayores de 15 años. De estos años de vida saludables perdidos, 15 023 fueron por años vividos con discapacidad (AVD) y 61 487 por años de vida perdidos por muerte prematura (AVP) (Wolf D.2010).

1.2 Formulación del Problema

¿La administración del extracto hidroalcohólico atomizado de *Zea mays* variedad morado tendrá efecto protector en la inducción de lesiones hepáticas?

1.3 JUSTIFICACION DE LA INVESTIGACION

1.3.1 Justificación teórica

El hígado, por su localización intermedia en el drenaje venoso del aparato digestivo y por ser una glándula de funciones complejas y vitales para el organismo, como son la síntesis de sustancias esenciales, reserva, destoxificación y es muy vulnerable a sufrir cambios funcionales y morfológicos debido a la acción de un gran número de factores que pueden producir hipoxia o toxicidad de este órgano. Este órgano noble puede ser lesionado por varios factores: infecciones virales, sustancias químicas y alimentos contaminados (aflatoxinas) (Lesson I. 1995).

El paracetamol en diversos estudios en ratas y ratones, tiene la propiedad de inducir lipoperoxidación y daño irreversible en el hepatocito, probablemente causados por radicales libres (Martín-Sanz P, Cascales M. 1990).

Los radicales libres de oxígeno son compuestos químicos caracterizados por poseer uno o más electrones desapareados. Algunos de ellos son extremadamente reactivos, como el radical hidroxilo (OH), otros menos reactivos como el radical superóxido (O_2) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que por definición no es considerado un radical libre de oxígeno, pero es potencialmente capaz de generar fácilmente OH. Los radicales libres pueden formarse intracelularmente en los peroxisomas, en la cadena transportadora de electrones, durante la fagocitosis, la autooxidación o como consecuencia de la interacción de metales de transición, como el hierro o cobre con ascorbato o peróxido de hidrógeno (Yu BP.1994, Troncoso L. 1996). Ciertos compuestos químicos ingeridos en la dieta, diversas sustancias tóxicas (humo del cigarrillo), radiaciones electromagnéticas, ozono y algunos medicamentos (paracetamol) pueden ejercer su acción nociva en el organismo a través de la generación de radicales libres, los que pueden dañar carbohidratos, lípidos, proteínas y ácidos nucleídos y, como consecuencia de ello, dañar seriamente las membranas celulares (Yu BP. 1994, Cheeseman K. 1993, Troncoso L. 1996).

En nuestro medio la causa más común de enfermedad hepática es el hígado graso no alcohólico (NAFLD) y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Frente a un diagnóstico de hepatopatía aguda o crónica los pacientes reciben tratamientos farmacológicos pero también deciden utilizar medicina alternativa como tratamiento coadyuvante. Diversas investigaciones han descubierto compuestos que presentan efectos protectores hepáticos y cuyo uso sería fundamental en diversas patologías como las hepatopatías inducidas por fármacos, hepatopatías virales, entre otras (Gisbert J. 1998).

El maíz morado es rico en antocianinas, sustancia que le da su coloración característica y que ha sido relacionada con efectos antioxidantes, hipolipemiantes e hipotensores (Arroyo J. 2007, Pedreschi R. 2006). Las antocianinas son los principales componentes del maíz morado, en especial el cianidin-3-glucósido (Salgado J. 2000, Aoki H. 2002). Las antocianinas han demostrado efecto modulador de radicales libres de oxígeno y diversas citoquinas (Reddy MK. 2005, Pedreschi R. 2006).

La presencia de antocianinas en las variedades pigmentadas del maíz morado, lo hace un producto potencial en antioxidantes naturales. La diversidad fenotípica del maíz en la región andina se expresa en una extraordinaria variabilidad en color, tamaño, textura del grano y de la mazorca (Goodman MM. et al., 1998).

En Investigaciones Farmacognósicas y Fitoquímicas reportan compuestos químicos como flavonoides, terpenos, taninos, aceites esenciales, resinas, saponinas, glicósidos, ácido salicílico, sales de potasio y sodio, azufre y fósforo. Las que destacan son las antocianinas, que es un tipo de flavonoide (Salgado et al., 2000; Arroyo et al., 2007)

1.3.2 Justificación práctica

En esta investigación la importancia está basado en el efecto protector del extracto hidroalcohólico atomizado del maíz morado (*Zea mays L.*) extraída exclusivamente de la coronta, sobre las lesiones inducidas hepáticas por el tetracloruro de carbono, permitirá probar la utilización de productos tóxicos determinando la actividad antioxidante y la actividad regenerativa del hígado. Con esta determinación de actividad protectora favorece el tratamiento natural de las enfermedades producidas a nivel del hígado y disminuir alteraciones de la misma.

Contribuir en ampliar el conocimiento de los usos del coadyuvante atribuidos al maíz morado. Ofertar un producto natural con una posible dosis efectiva media de maíz morado que permita la protección hepática por injuriantes químicos. Legar un producto protector hepático de bajo costo y que ha sido corroborado a nivel anatomopatológico, que permitiría una formulación farmacéutica para posteriores ensayos clínicos.

1.4 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

1.4.1 OBJETIVO GENERAL:

- Determinar el efecto protector del extracto hidroalcohólico atomizado de *Zea mays* en lesiones hepáticas inducida en ratas.

1.4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico atomizado del maíz morado.
- Demostrar la eficacia protectora del extracto hidroalcohólico atomizado del *Zea mays* al ser administrado por vía oral en ratas con inducción de lesión hepática y en normales.
- Verificar el estrés oxidativo con inducción de lesión hepática post administración del extracto hidroalcohólico atomizado del maíz morado en ratas.
- Explicar el posible mecanismo de acción protector del extracto hidroalcohólico atomizado del *Zea mays* al ser administrado por vía oral en ratas con inducción de lesión hepática.
- Realizar el estudio anatomopatológico de tejido hepático en ratas con inducción de lesión hepática pos administración por vía oral el extracto hidroalcohólico atomizado del *Zea mays*.

II. MARCO TEORICO

2.1 ANTECEDENTES DEL PROBLEMA

2.1.1 Antecedentes Internacionales

El hígado, por su localización intermedia en el drenaje venoso del aparato digestivo y por ser una glándula de funciones complejas y vitales para el organismo, como son la síntesis de sustancias esenciales, reserva y destoxificación, aunado a que recibe el drenaje venoso proveniente del tracto gastrointestinal, es muy vulnerable a sufrir cambios funcionales y morfológicos debido a la acción de un gran número de factores que pueden producir hipoxia, algunos materiales tóxicos absorbidos y la combinación de otros agentes etiológicos que llegan al hígado a través del sistema porta (Lesson I. 1995).

Entre los compuestos que han merecido dichos estudios se encuentran las antocianinas, debido a la presencia de sustituyentes -OH, los cuales son moléculas con alto poder antioxidante (Kong J. 2003). La presencia de antocianinas en las variedades pigmentadas del maíz, lo hace un producto potencial para el suministro de colorantes y antioxidantes naturales. Por ello el estudio de los pigmentos del maíz morado (*Zea mays*) ha despertado un interés sin precedentes. La diversidad genética del maíz se distribuye en razas. En América se han originado el 90% de todas las razas. Según Goodman y Brown (1988), en América hay 260 razas de las que 132, aproximadamente la mitad, se encuentran en la región andina. Dos factores son la causa de esa gran diversidad: la variación en usos y la gran variación ecológica. La diversidad fenotípica del maíz en la región andina se expresa en una extraordinaria variabilidad en color, tamaño, forma, textura del grano y de la mazorca (Goodman M. 1998).

La determinación por cromatografía de HPLC (High Performance Liquid Chromatography), caracterizaron dos fracciones de extractos: Fracción acuosa y fracción de acetato de etilo. La fracción acuosa fue rica en antocianinas: cianidina-3- β -glucósido, pelargonidina-3- β -glucósido y peonidina-3- β -glucósido. La fracción de acetato de etilo contenía ácidos fenólicos como en ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido de vainillina, ácido protocatéquico, flavonoides derivados de la quercetina y hesperidina (Pedreschi et al. 2006). Entre los compuestos de dichos estudios se

encuentran las antocianinas, debido a la presencia de sustituyentes -OH, los cuales son moléculas con alto poder antioxidante (Kong J. 2003).

En los laboratorios del Departamento de Investigaciones de Horticultura de la *University in Collage Station, Texas*, se cuantifico el contenido de antocianinas y fenoles totales de la tusa de maíz morado, reportándose el contenido de antocianinas y fenoles totales en 1642 mg/100g y 1756 mg/100g (Lieberman S. 2007). Los antioxidantes son sustancias que se encuentran en las Especies Reactivas de Oxígeno (EROs) pequeñas concentraciones en comparación a un sustrato oxidable, que retrasa o inhibe significativamente la oxidación del sustrato, y también estabiliza las EROS mediante la cesión de un H⁺ y las convierte en compuestos no radicalarios. Otras definiciones hablan de antioxidante como cualquier sustancia que, al estar presente en bajas concentraciones comparada a las de un sustrato oxidable, previene o retarda la oxidación de dicho sustrato y que protege a los sistemas biológicos frente a efectos potencialmente perjudiciales tanto de procesos como reacciones que causan excesivas oxidaciones (Halliwell B. 1999).

El tetracloruro de carbono (TCC) provoca daño al hígado desde un simple cambio graso a cirrosis. La manifestación más temprana y común es un cambio graso macro vesicular reversible. El cambio más importante es la esteatohepatitis no alcohólica (NASH). El tetracloruro de carbono provoca una esteatosis, acumulación de grasa, que tiende principalmente a ser centrilobular, en oposición a una localización periportal en proceso como cirrosis biliar primaria u obstrucción biliar. El predominio central o centrilobular del daño hepatocelular con tricloroetanol puede originar una fibrosis centrilobular, y finalmente una cirrosis (Sternberg S. 1999)

2.1.2 Antecedentes Nacionales

Muchas Investigaciones farmacognósticas (estudios de principios activos naturales) y Fitoquímicas (composición química vegetal) reportan del fruto compuestos químicos como los Flavonoides, terpenos, taninos, aceites esenciales, resinas, saponinas, glicósidos, ácido salicílico, sales de potasio y sodio, azufre y fósforo. Las que más destacan son las antocianinas, principalmente la cianidina-3-β-glucosido, de color violáceo, que es un tipo de flavonoide (Salgado et al., 2000; Arroyo et al., 2007).

A nivel mundial las causas principales de cirrosis hepática son el consumo crónico de alcohol y la enfermedad viral crónica. Causas menos frecuentes, son las enfermedades hepáticas autoinmunes (hepatitis autoinmune, cirrosis biliar primaria y colangitis esclerosante primaria), las enfermedades metabólicas (deficiencia de alfa-1-antitripsina, enfermedad de Wilson, Hemocromatosis, Fibrosis Quística) así como la Esteatosis Hepática No Alcohólica (NASH), (Bustíos C, Dávalos M, Román R, Zumaeta E. 2006).

2.2 BASES TEORICAS

El hígado desempeña un papel extremadamente importante en el metabolismo energético: almacena glucosa en forma de glucógeno, convierte algunos aminoácidos en glucosa y degrada lípidos. También es importante en la biosíntesis: sintetiza todas las proteínas plasmáticas a excepción de las inmunoglobulinas, incluyendo el complemento y los factores de la coagulación. También fabrica proteínas portadoras para el colesterol y los triacilglicerolos. El hígado secreta bilis, que contiene sales biliares cruciales para la emulsión de las grasas antes de su digestión y absorción. Finalmente, este órgano convierte amoníaco en urea, mucho menos toxica, y añade grupos polares a muchos fármacos, algunas hormonas y determinados metabólicos para que puedan ser excretados en la orina o en la bilis. Microscópicamente, el hígado está formado por lobulillos separados por septos. Los lobulillos son unas estructuras más o menos hexagonales, que forman las unidades funcionales del órgano; cada uno está formado por una vena central que desemboca en la vena hepática y a partir de la cual irradian columnas de hepatocitos en dirección a la delgada capa de tejido conjuntivo que las rodea. Entre los hepatocitos existen unos pequeños canalículos biliares que desembocan en los conductos biliares y, finalmente, en los conductos biliares terminales. En cada uno de los seis ángulos de un lóbulo se sitúa una triada portal, denominada así porque en ella existen siempre tres estructuras: una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y un conducto biliar (Levy M, Koeppen B, Stanton B. 2006).

El hígado realiza muchas funciones diferentes, como funciones del hígado, entre ellas, 1) la filtración y el almacenamiento de sangre; 2) el metabolismo de los hidratos de carbono, proteínas, grasas, hormonas y compuestos químicos extraños; 3) la formación de la bilis; 4) el almacenamiento de vitaminas y de hierro, y 5) la formación de los factores de la coagulación. El lobulillo hepático, se constituye alrededor de una

vena central que desemboca en las venas hepáticas y luego, en la vena cava. El propio lobulillo se compone, de múltiples placas celulares hepáticas. Cada placa hepática suele componerse de dos células y entre las células adyacentes se encuentran pequeños canalículos biliares que drenan en el conducto biliar, en los tabiques fibrosos que separan los lobulillos hepáticos adyacentes. Los tabiques también llevan vénulas portales que reciben, la sangre portal del tubo digestivo. Desde estas vénulas, la sangre se dirige hacia las sinusoides hepáticos planos, ramificados, ubicados entre las placas hepáticas, y después, hacia la vena central. Las células hepáticas están constantemente expuestas a la sangre venosa portal. Aparte de las células hepáticas, las sinusoides venosas están tapizados por otros dos tipos de células: 1) las células endoteliales, y 2) las grandes células de Kupffer (también denominadas células reticuloendoteliales), un tipo de macrófago que fagocita las bacterias y otros cuerpos extraños de la Sangre de las lagunas hepáticas (Guyton A. 1998).

La cirrosis consiste en una distorsión irreversible de la arquitectura hepática normal, caracterizada por lesiones hepáticas, fibrosis y regeneración nodular. Las presentaciones clínicas de la cirrosis son una consecuencia de la disfunción hepatocelular progresiva y de la hipertensión portal. En casi 40% de los casos de cirrosis, esta se diagnostica en la necropsia de pacientes que no manifiestan signos evidentes de enfermedad hepática en etapa terminal. En la cirrosis están involucrados los incrementos o las modificaciones en las síntesis del colágeno y de otros componentes del tejido conjuntivo o de la membrana basal. El VHB son agentes productores de fibrosis sobre bases inmunitarias. Los agentes como el tetracloruro de carbono o la hepatitis. El responsable directo de todos estos mecanismos de incremento en la fibrogenesis pueden ser las células almacenadoras de grasa en el sistema reticuloendotelial Hepático. Al parecer la fibrosis hepática tiene lugar en dos etapas. La primera se caracteriza por un cambio en la composición de la matriz extracelular de un colágeno sin enlaces cruzados y no formadora de fibrilla a un colágeno más denso y sujeto a la formación de enlaces cruzados. En esta etapa la lesión hepática puede revertirse. La segunda involucra la formación de enlaces cruzados en el colágeno subendotelial, la proliferación de las células mioepiteliales y la distorsión de la arquitectura hepática con la aparición de nódulos de regeneración. Esta segunda etapa es irreversible. Las modificaciones en la composición de la matriz extracelular pueden mediar cambios en las funciones celulares de los hepatocitos y de otras células como los lipocitos. Por tanto, el cambio en el equilibrio del colágeno

puede tener una participación crucial en el avance de la variante reversible a la irreversible en la lesión hepática crónica, al afectar también la función del hepatocito (Ganong W, Macphee S. 2007).

Los agentes antioxidantes establecen donación de electrones o átomos de hidrógeno a los radicales libres. Los agentes antioxidantes presentes en alimentos como el maíz morado pueden reducir trombosis, activar macrófagos e inhibir la tendencia a la peroxidación (Block et al., 1992). Los antioxidantes pueden anular los efectos perjudiciales de los radicales libres en las células (Carhuapoma YM. 2006). Como resultado de sus investigaciones, recomiendan complementar como parte de la dieta el consumo de maíz morado, ya que resultó ser un excelente antioxidante (Cevallos BA, Cisneros ZL. 2003).

La Insuficiencia hepática alcohólica es relativamente frecuente (casi 2.800 casos/año en EE. UU). Tanto en EE. UU. Como en el Reino Unido la IHA inducida por fármacos en particular el acetaminofeno, ha superado en prevalencia a la IHA por hepatitis viral. En 2002, la toxicidad por acetaminofeno fue la causa de fallo hepático en el 39% (120 de 308) de los pacientes mientras que las IHA no relacionadas con el acetaminofeno ni los virus fueron el 13% y el 12% de los casos, respectivamente. La edad media en el momento del diagnóstico fue 38 años, con predominio de mujeres; la incidencia fue mayor entre los sujetos de raza blanca (Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiodt F.2002).

Los virus hepatótrofos son causas conocidas de IHA. En EE. UU, los virus de la hepatitis A y B representan la causa viral más común (aproximadamente 4% y 8%, respectivamente). (Polson J, Lee W. 2005). Reciente investigación nacional en población cirrótica no expuesta a hemodiálisis, señala tan sólo 6.6% de infección viral por VHC. (Balbín G, Cuera A, Vildósola H. 2006). La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) es un problema de salud pública de gran trascendencia a nivel mundial, sobre todo si se tiene en cuenta su relación etiológica con la enfermedad hepática crónica (Poynard T, Bedossa P, Opolon P. 1997; Poynard T, Ratziu V, Charlotte F, Goodman Z, Mc Hutchison J, Albrecht J. 2001). Se ha estimado que a nivel mundial, la infección por hepatitis viral C es la responsable del 27% de los casos de cirrosis hepática, y del 25% de los casos de carcinoma hepatocelular. (Alter M, 2007).

2.2.1 Marcos Conceptuales

2.2.1.1 Aspectos Generales del Zea mays L. variedad morada

El maíz es una planta oriunda de América, una de las plantas más conocidas en el mundo y una de las más antiguas que el hombre haya domesticado (Bonavia D. 1991). El origen del maíz es muy remoto. Se cultiva en el Perú desde épocas precolombinas; su antigüedad está comprobada por las mazorcas encontradas en las tumbas antiquísimas así como las representaciones del maíz está presente prácticamente en todas las culturas y casi siempre en un contexto religioso (Bonavia D. 1991). Se considera que Colon lo llevo a España en su primer viaje, en 1498 se cultivó en castilla y en Andalucía en 1826. Mc Bride (1963), señala que es nativo de las alturas de México o América Central, pero que no es conocido en estado silvestre, ni es capaz de mantenerse en competencia con otras plantas silvestres (Lock O.1997). Sin embargo actualmente se han presentado pruebas que señalan que el maíz se ha difundido en Sudamérica en estado silvestre antes de la llegada del hombre (Bonavia D. 1991). Las diversas variedades de maíz morado provienen de la raza ancestral Culli (que significa negro). Las formas típicas están casi extinguidas, la raza culli es una de las 5 razas ancestrales de las que se han originado todas las demás, actualmente en extinción en el mundo. Existen muy pocas razas que presentan pigmentos antocianicos tanto en el grano como en la tusa. En el Perú la raza culli se cruzó con otras razas, transfiriendo sus colores característicos a las razas derivadas, como el Huancavelicano, piscoruto, Cuzco, huayleño, Arequipeño e Iqueño; sin embargo se han producido variedades más desarrolladas y de mayor rendimiento mediante la técnica de cruzamiento y de selección. El maíz Culli de Bolivia es muy parecido al peruano tanto en la intensidad de coloración del grano como la morfología de la planta y la mazorca. (Derteano C. 1980). Existen evidencias de que originalmente el maíz fue domesticado en dos centros independientes, Perú y México (Tovar O. 1993). Es conocida la Asociación de coloración de antocianina en plantas de maíz con su distribución de acuerdo a la altitud; maíces distribuidos a niveles de mayor altura presentan alta intensidad de coloración la cual disminuye hasta verde a nivel del mar. El maíz ecuatoriano parece haberse originado del cruzamiento entre culli ancestral con razas de mazorcas grandes. El Culli Argentino es parecido el de Ecuador con la diferencia de que los granos son más duros. El negrito chileno tiene una mazorca más chica y de los granos más delgados presentando más hileras de granos.

Se puede afirmar categóricamente que el maíz morado es originario de América y del Perú. Las antiguas civilizaciones peruanas y mexicanas lograron domesticar el maíz, realizando mejoramientos genéticos. Sin embargo, solo en los ecosistemas peruanos se ha logrado un maíz morado, rico en cianidina (con un contenido de 73 %) en México crece el maíz azul, con su marcador químico predominante la delphinidina (Del Pozo *et al.* 2006).

UBICACION TAXONOMICA DEL MAIZ MORADO

El maíz morado es una planta monocotiledonea de estambres hipogénicos, pertenecientes a la familia de las gramíneas. La posición botánica, según la Dirección del Museo de Historia Natural de la U.N.M.S.M. Es la siguiente:

División : SPHERMATOPHITA
Clase : MONOCOTYLEDONEAE
Subclase : LILIDAE
Orden : POALES
Familia : POACEAE
Subfamilia : ANDROPOGONOIDEAE
Tribu : MAYDEAE
Género : Zea
Especie : *Zea mays* L.
Variedad : morada
Nombre vulgar: Maíz Morado

En el Perú existen diversas variedades entre las mencionadas por Soukup, tenemos el culli que tiene granos rojo-oscuro casi morado que se emplea para la chicha morada o como colorante de vianda y la variedad hañakaa (v. Aymara) llamada maíz morado. Otras variedades tradicionales más conocidas son:

Cuzco morado: variedad relacionada a la raza Cuzco gigante. Es tardía, de granos grandes, dispuestos en mazorcas de 8 hileras muy bien definidas. Su cultivo se da en lugares de zonas de latitud intermedia, en los departamentos de Cuzco y Apurímac.

Arequipeño: la forma de la mazorca es similar la variedad Cuzco, pero más chica. Los granos están dispuestos en hileras regulares. El color de la tusa es de menor intensidad y más precoz que otras variedades.

Morado Canteño: derivada de la raza Cusco, por lo que las características de la mazorca son muy similares, aunque de dimensiones menores. Su cultivo se presenta en diferentes lugares de la sierra del Perú especialmente en las zonas altas del valle de chillón (lima) y hasta los 2500 msnm.

Morado de caraz: Es una variedad derivada de las razas ancashino y Alazan. Se cultiva en la provincia de caraz (Ancash) y puede adaptarse también en la costa ya que es de precocidad intermedia. Esta variedad muestra mayor rendimiento y presenta una tusa más pigmentada.

Negro de Junín: Es una variedad precoz, de granos grandes y negros dispuestos irregularmente en una mazorca corta y redondeada. Se encuentra en la sierra, centro, sur, hasta Arequipa, ocupando alturas mayores que el resto de variedades.

Variedad mejorada: La producción de PMV 581, variedad mejorada por el programa de maíz (PM) de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM); sus características son: mazorca cilindro cónicas, granos amiláceos blandos, de color negro y tusa de color morado. La planta tiene un periodo vegetativo medio. Mide de 2.0 a 2.4 metros de altura, con una o dos mazorcas plantados en la longitud del tallo. La selección se hizo con la finalidad de lograr rendimientos altos de pigmento principal antocianina, mejorar su resistencia a plagas (Roja y Coscospora) y ampliar su adaptación en toda la costa y sierra del Perú. Además se han desarrollado otras variedades como PMV-582 y Negra Tomasa (INIA) (Derteano C. 1980)

INIA 615 -Negro Canaan: Deriva a partir de 36 colecciones de cultivares locales de la raza kully colectadas en el año 1990 en las provincias de huanta , Huamanga y san miguel, mejoradas por Selección Recurrente de Medios Hermanos durante 9 ciclos. Sus progenitores femeninos son de las variedades locales Negro, kully y Morado. Sus progenitores masculinos provienen de tres variedades balanceadas Negro, kully y Morado. Prospera perfectamente a las condiciones de los valles interandinos de la Sierra, desde los 2000 - 3000 msnm. Es el resultado de los trabajos de investigación realizados en la Estación Experimental Agraria Canaán-Ayacucho, del INIA (Requis F. 2007).

De acuerdo a las zonas de cultivo se conocen como maíz centeno, morado de Caraz, negro de Junín, Cusco morado, Arequipeño, entre otros; también se cultiva en Ayacucho, Cajamarca y Huancavelica. La materia colorante lo componen las antocianinas, de las cuales se han determinado, 3-glucosidos de cianidina, pelargonidina, peonidina, 3-galactosido de cianidina, libres y acilados (Salgado J. 2000). El uso principal desde antiguo es en la preparación de la chicha morada y

mazamorra morada; actualmente se preparan extractos acuosos atomizados para ser comercializados como colorantes naturales; aunque los volúmenes de producción aun no compiten con las enocianinas (Lock O.1997).

Glosario de términos

Efecto Modulador. Es la protección de la excesiva cantidad de oxígeno produciendo radicales libres oxigenados.

Farmacognosia. Estudia tanto sustancias con propiedades terapéuticas como sustancias tóxicas y otras sustancias de interés farmacéutico que puedan tener un uso básicamente tecnológico y no terapéutico.

Especies reactivas de Oxígeno. Son generalmente moléculas muy pequeñas altamente reactivas debido a la presencia de una capa de electrones de valencia no apareada. Estas especies se forman de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno y tienen un importante papel en la señalización celular.

Virus hepatótrofos. Tipos de Virus que poseen afinidad para el hígado.

Indicador. Es una sustancia que siendo ácidos o bases débiles al añadirse a una muestra sobre la que se desea realizar el análisis, se produce un cambio químico que es apreciable, generalmente, un cambio de color; esto ocurre porque estas sustancias sin ionizar tienen un color distinto que al ionizarse.

Extracto. Es una sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua.

Maltodextrina. Es el resultado de la hidrólisis del almidón o la fécula, normalmente se presenta comercialmente en forma de polvo blanco, compuesto por una mezcla de varios oligómeros de glucosa, compuestos por 5 a 10 unidades.

Inducción. Es proceso de conocimiento que consiste en observar circunstancias particulares y a partir de ellas generar una conclusión general.

Fitoquímica. Es una especialidad que deriva de la Farmacognosia y se dedica al estudio químico de las plantas medicinales.

III. HIPOTESIS Y VARIABLES

3.1 HIPOTESIS GENERAL

- El extracto hidroalcohólico atomizado de *Zea mays L.* variedad morado al ser administrado por vía oral tiene efecto protector de las lesión hepática inducida en ratas.

3.2 HIPOTESIS ESPECÍFICA

- Las antocianinas del extracto hidroalcohólico atomizado del *Zea mays L.* al ser administrado por vía oral tiene efecto hepatoprotector en lesión hepática y en normales.
- Las estructuras histológicas hepáticas dañadas presentan una regresión normal del tejido hepático en ratas con inducción de lesión hepática.

3.3 IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE DEPENDIENTE: Lesión hepática

VARIABLE INDEPENDIENTE: Extracto hidroalcohólico atomizado de maíz morado (*Zea mays L.*).

3.4 OPERACIONALIZACION DE VARIABLES

VARIABLE	CONCEPTUAL	OPERACIONAL	INDICADOR	UNIDAD DE MEDICION
Variable Dependiente Lesión hepática	Lesión hepática Inducida en ratas	La administración de tetracloruro de carbono (CCl ₄) se realizó por vía oral y la absorción de grandes cantidades puede provocar colapso vascular y necrosis de las células hepáticas, o al menos degeneración grasa debido a un bloqueo de la movilización de triglicéridos en las células hepáticas, lo que ocasiona acumulación progresiva de estos (Sumano O. 2007)	Estructura celular hepática Perfil hepático: hemoglobina Plasmática. Transaminasas (TGP, TGO) MDA	Lesión: ausente, leve, moderada, severa gr/dl UI/dl nmol/mL
Variable independiente Extracto Hidroalcohólico o atomizado de <i>Zea mays</i> L.	Extracto Hidroalcohólico de la coronta de maíz morado	Se separar los granos de la coronta de <i>Zea mays</i> L., luego se dejó secar a temperatura ambiente (18-22 °C). Se pulverizo en un molino de granos. Se agregó etanol al 70% en una proporción 10 g de pulverizado/200 mL de alcohol y se dejó macerar durante ocho días. (Moreno O, Paz-Aliaga A. 2010)	Extracto Hidroalcohólico o atomizado de maíz morado	Mg/kg

3.5. MATRIZ DE CONSISTENCIA

ASPECTOS GENERALES	PROBLEMA	OBJETIVO	HIPOTESIS	METODOLOGIA
<p>Variable Dependiente</p> <p>Lesión hepática</p> <p>Variable Independiente</p> <p>Extracto Hidroalcohólico o atomizado de <i>Zea mays</i> L.</p>	<p>La lesión hepática y cirrosis hepática es uno de los principales problemas de salud en el mundo, debido a su alta morbilidad y mortalidad.</p>	<p>Objetivo General.</p> <p>Determinar el efecto protector del extracto Hidroalcohólico atomizado de <i>Zea mays</i> L. sobre lesiones hepáticas inducidas por CCL₄ en ratas</p> <p>Objetivos específicos</p> <p>Demostrar la eficacia protectora,</p> <p>Determinar los metabolitos secundarios,</p> <p>Explicar el posible mecanismo de acción protector y</p> <p>Realizar el estudio Histológico de tejido hepático en ratas con inducción de lesión hepática.</p>	<p>El extracto Hidroalcohólico atomizado de <i>Zea mays</i> L. variedad morado al ser administrado por vía oral tiene efecto protector de la lesión hepática inducida en ratas.</p>	<p>Se utilizaron dos modelos de inducción de lesión hepática crónica; 1) TC en dosis 0.2 ml/kg; y 2) fenobarbital en agua de beber 0.5mg/ml más TCC 2ml/kg de dosis.</p> <p>Consideraciones éticas</p> <p>La eutanasia de los animales permitirá una rápida pérdida de conciencia sin dolor o miedo, seguido por un alivio progresivo hasta la muerte del animal.</p> <p>Tratamiento estadístico</p> <p>Se utilizara la prueba de ANOVA, Student y Tukey.</p>

IV. METODOLOGIA

4.1. Materiales y Equipos.

4.1.1. Material biológico

Se utilizó ratas albinas machos cepa Holtzmann de 10 semanas de edad; con peso promedio de 280 ± 20 g procedentes del Instituto Nacional de Salud del local ubicado en el distrito de Chorrillos de la ciudad de Lima y fueron acondicionados en el Bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con condicionamiento previo de 48 horas, con agua y alimento *ad libitum*, ciclo luz-día de 12 horas y temperatura de 22 a 26 °C.

La Coronta de maíz *Zea mays L.* Variedad morada. Fue procesado en el laboratorio Fitofarma E.I.R.L. de la siguiente manera: Preparación del extracto hidroalcohólico de *Zea mays L.* Se separaron los granos de la coronta. La coronta se llevó a sequedad a temperatura menor de 40 °C; se la pulverizó en molino, luego fue sometida a maceración en una solución hidroalcohólica y, después de ocho días, se filtró y el producto obtenido se sometió a una operación de atomización, resultando un polvo fino denominado extracto hidroalcohólico atomizado de *Zea mays L.*, el que se mezcló con maltodextrina para su mejor estabilidad, este proceso ha sido desarrollado por Laboratorios Fitofarma EIRL (Arroyo, et al., 2002)

4.1.2. Material de laboratorio

- Pipetas Pasteur
- Tubos de vidrio c/tapa rosca
- Tubos microcentrifuga Eppendorf
- Beackers 500 y 1000 ml Kimax
- Placas petri
- Jeringas descartables

4.1.3. Equipos

- Molino de cuchillas (Willey Mill St. Modell N°3)
- Homogenizador de Potter (Elvehjem)

- Estufa de aire circulante (Memmert PO VL 40 - 220°C)
- Cocinilla eléctrica (general electric)
- Balanza Analítica (Mettler)
- pH metro (Fisher Scientific. Accumet Basic. Model AB 15)
- Centrifuga (International Portable Refrigerated. Model PR-2)
- Espectrofotómetro (Spectronic. Genesys Z)
- Estufa con termostato adaptado
- Vacutainer
- Equipo de disección

4.1.4 Material farmacológico y reactivo

- Tetracloruro de Carbono (Merck)
- Agua Destilada
- Silimarina (Sherfarma S.A.C.)
- Fenobarbital (Sigma)

4.1.5. Preparación de los animales

Los animales fueron mantenidas en jaulas de crianza, con un ciclo de luz-oscuridad 12:12, a una temperatura ambiental aproximada de 23°C. De igual manera recibieron una dieta balanceada para roedores preparada por el Departamento de Nutrición de la UNALM y agua *ad libitum*, condiciones equivalentes para el total de los animales durante la experimentación. Luego sometidos a una semana de adaptación al ambiente de bioterio.

4.2. INDUCCIÓN DE LA LESIÓN HEPÁTICA

La inducción de la lesión hepática se realizó mediante 1 modelo experimental:

4.2.1. MODELO EXPERIMENTAL.

INDUCCIÓN DE LA LESIÓN HEPÁTICA UTILIZANDO FENOBARBITAL MÁS TETRACLORURO DE CARBONO

Se les administró fenobarbital de 200mg a concentración de 0,5 g / L en agua potable (*ad libitum*), por un tiempo de dos semanas, luego de este tiempo se le administró tetracloruro de carbono (CCl₄) a una dosis de 0.2ml/kg (Proporción de 1:1), se le administro por vía oral (Samudram P, et al., 2008). Los indicadores de evaluación para este modelo fueron el stress oxidativo y la observación de las láminas histopatológicas.

La actividad antioxidante se determinó en suero al último día del experimento siguiendo la técnica de Buege J, *et al.*, (Buege JA. 1978), perfil hepático e histopatología. Los indicadores de evaluación del perfil hepático fueron: las transaminasas (TGP, TGO), albuminas (proteínas) y bilirrubina.

Tabla 1. Diseño experimental para la inducción de la lesión hepática utilizando fenobarbital más tetracloruro de carbono.

TRATAMIENTO	MUESTRA
Control normal	10
Control con CCl ₄ 0.2 mL/kg (TCL)	10
CCl ₄ + Silimarina 25mg/kg	10
CCl ₄ + Maíz morado 500 mg/kg	10
CCl ₄ + Maíz morado 1000 mg/kg	10
CCl ₄ + Maíz morado 2000 mg/kg	10

4.3. ESTUDIO HISTOLÓGICO

Una vez sacrificados los animales al administrar pentobarbital 100 mg/kg, se procedió a realizar cortes de hígado: 0,5 x 1,0 cm de espesor, los que fueron fijados en formol neutro al 10%, siendo seccionados para inclusión en porciones de 2 mm de espesor; posteriormente, se efectuó cortes con micrótopo, en un espesor de 3 a 5 micras, para luego ser coloreados con HE (hematoxilina–eosina) y revisados con microscopio óptico (Samudram P, Rajeshwari H, Vasuki R, Geetha A, Sathiya P. 2008), siendo los indicadores de medida que fueron: (-) = ausente, (+) = leve, (++) = moderado, (+++) = severo.

Realizado el perfil hepático, se sacrificaran a los animales del grupo 1, 2, 3, 4 y 5 por el método de la eutanasia y se les extrajo el hígado de los animales. Se realizó cortes histológicos de los hígados de las ratas sin y con insuficiencia hepática, existiendo una diferenciación celular de los hepatocitos entre los hígados sanos y enfermos (Moreno L, Herrera A, Oyola L, Arroyo JL, Marrufo L. 2003).

4.4. DETERMINACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN RATAS

Se utilizó el método de (Buege JA, 1978), midiendo la producción de malondiladehído (MDA) que al reaccionar con el Ácido Tiobarbitúrico (TBA) forma un complejo coloreado que se lee a 535 nm. Se realizó mediante el siguiente procedimiento: colocar en un tubo de ensayo con tapa rosca 0.3 ml de suero y 0.6 ml de ácido tricloroacético al 20%. Tapar el tubo y mezclar. Llevar a Baño María hirviente por 10 minutos. Enfriar y añadir 0.9 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.67% en ácido clorhídrico 0.25N. Mezclar, llevar a baño maría hirviente por 30 minutos. Enfriar con agua helada. Centrifugar a 4000 RPM por 10 minutos. Separar el sobrenadante en el espectrofotómetro a 535 nm. Para los cálculos se utilizó el coeficiente de extinción molar $1,56 \times 10^5 \text{ mmol}^{-1}$ del complejo coloreado formado por el malondialdehído (Arroyo J, 2002).

V. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. RESULTADOS

Los hallazgos del estudio fitoquímico preliminar muestran una gran cantidad de compuestos fenólicos, flavonoides y glicósidos caracterizados mediante las pruebas de tricloruro férrico, de Shinoda y de Molish respectivamente, en el extracto Hidroalcohólico atomizado del maíz morado (Tabla 2).

Tabla 2. Prueba preliminar cualitativa de los metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico atomizado de Maíz Morado (*Zea mays L.*),

Reactivo	Resultado	Metabolitos
NINHIDRINA	(-)	Aminoácidos Libres
GELATINA	(-)	Taninos
CLORURO FERRICO (FeCl ₃)	(+++)	Compuestos Fenólicos
DRAGENDÖRFF	(+)	Alcaloides
MAYER	(+)	Alcaloides
SHINODA	(+++)	Flavonoides

(-) = Ausencia; (+) = Poca cantidad; (++) = Regular cantidad; (+++) = Bastante cantidad.

La evolución temporal de peso según el modelo experimental como indica la figura 1 entre el tratamiento y el incremento de peso de las ratas según las concentraciones del maíz Morado variedad *Zea mays L.*

El efecto protector del extracto hidroalcohólico atomizado del maíz morado fue evaluada al observar los cambios del peso corporal e indicadores bioquímicos: colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos, Fosfatasa alcalina y TGP. En las figuras 1 a 7 se muestra los cambios sobre el perfil hepático, donde se aprecia el incremento de colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos, Fosfatasa alcalina y TGP, también disminución de colesterol, HDL y fosfatasa alcalina; y los tratamientos con silimarina, extracto hidroalcohólico atomizado de maíz morado mejoraron estos desniveles. El

tetracloruro de carbono aumentó el TGP y redujo la HDL.

En la figura 1 muestra el efecto directo que tiene el CCL₄ sobre la reducción del peso por efecto del daño hepático y el normal incremento en los tratamientos con las 3 respectivas dosis.

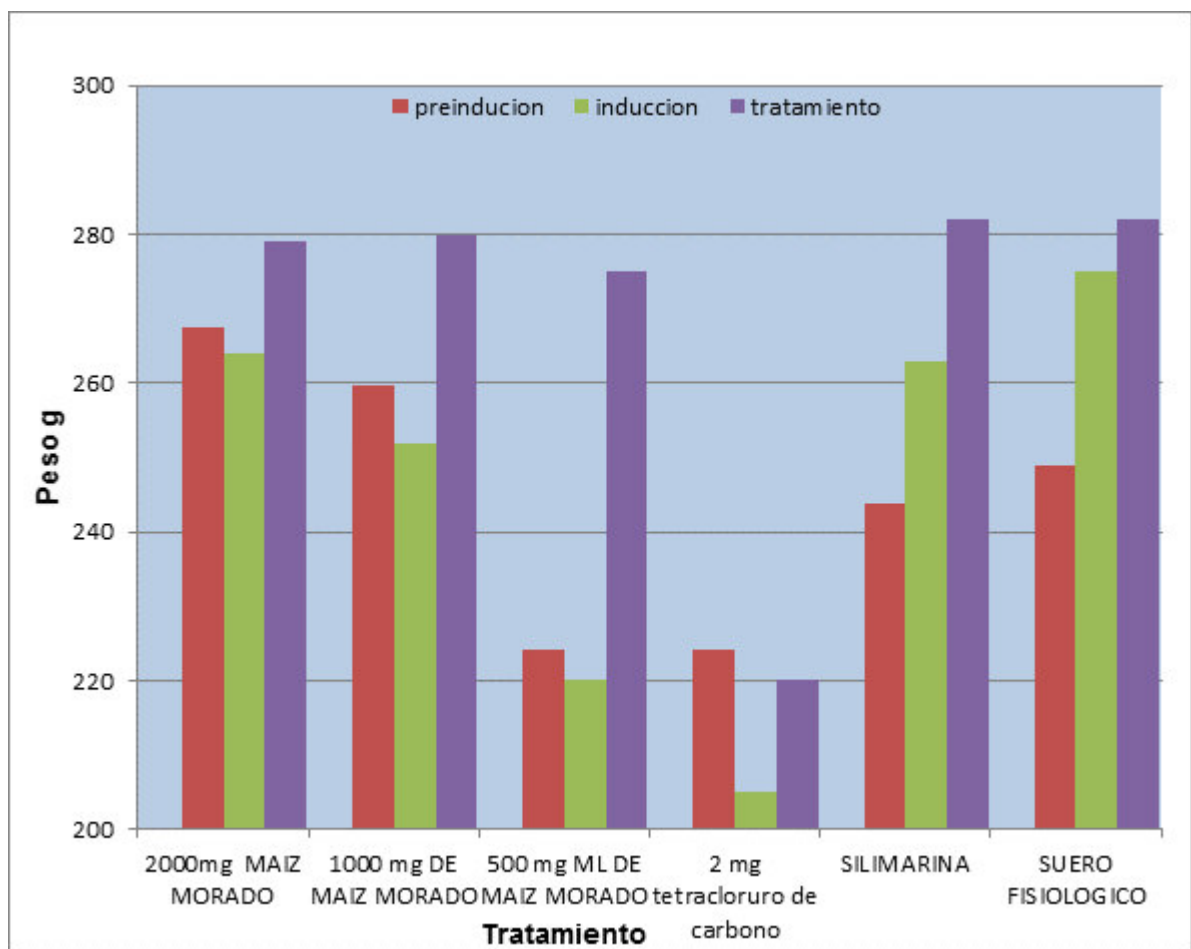


Figura 1. Evolucion temporal de los pesos con el segundo modelo experiemetal de induccion con tetracloruro de carbono.

Al final del tratamiento de este modelo aplicado muestra una disminicion del peso corporal de la rata por el daño hepático producido por efecto de la toxicidad que tiende a incrementar conforme se realiza el tratamiento crónico con el extracto Hidroalcohólico atomizado del maiz morado.

En el análisis del perfil hepático según las figuras 2 al 6 indican que a dosis de 1000 mg/kg existe una mayor respuesta al efecto protector del Maíz morado e indican una mejor cercanía a los valores normales de estos indicadores.

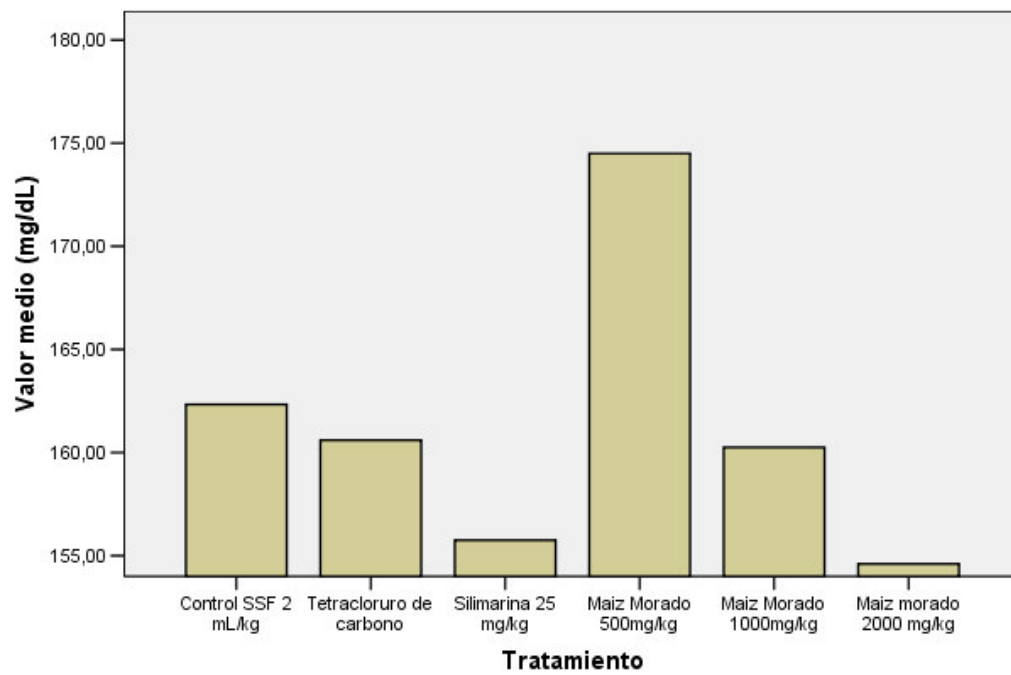


Figura 2. Niveles de colesterol al evaluar el efecto protector en ratas

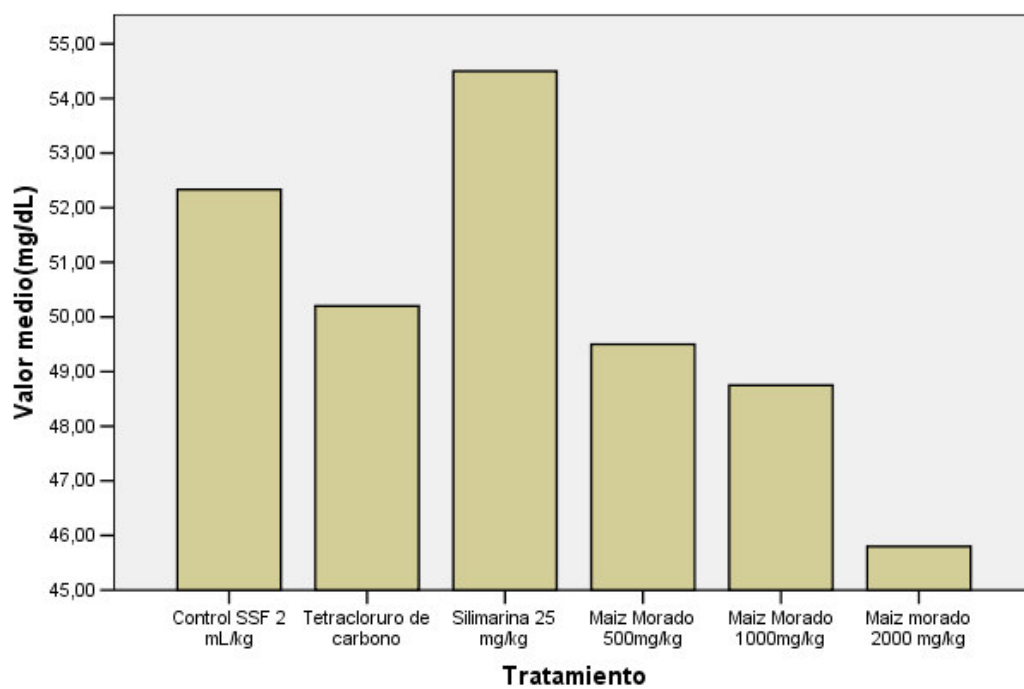


Figura 3. Niveles de HDL al evaluar el efecto protector hepatico en ratas

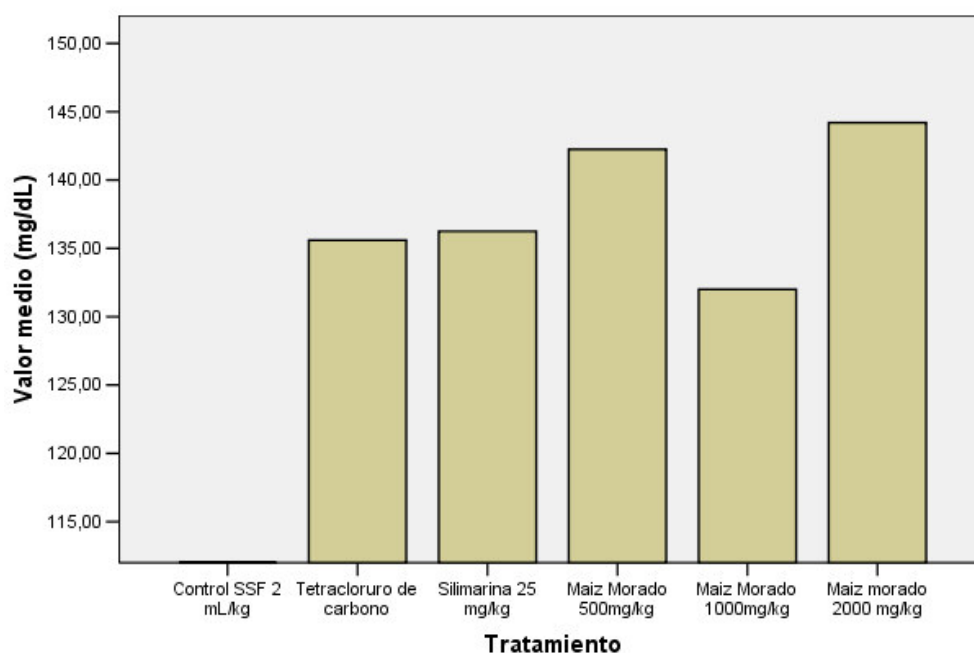


Figura 4. Niveles de trigliceridos al evaluar el efecto protector hepatico en ratas

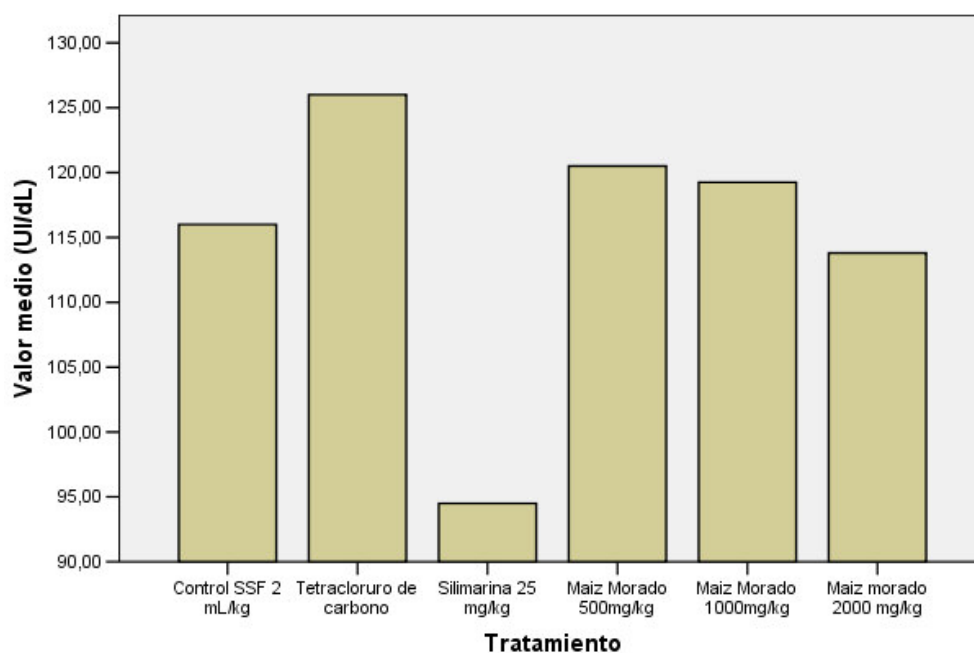


Figura 5. Niveles de fosfatasa alcalina el evaluar el efecto protector hepatico en ratas

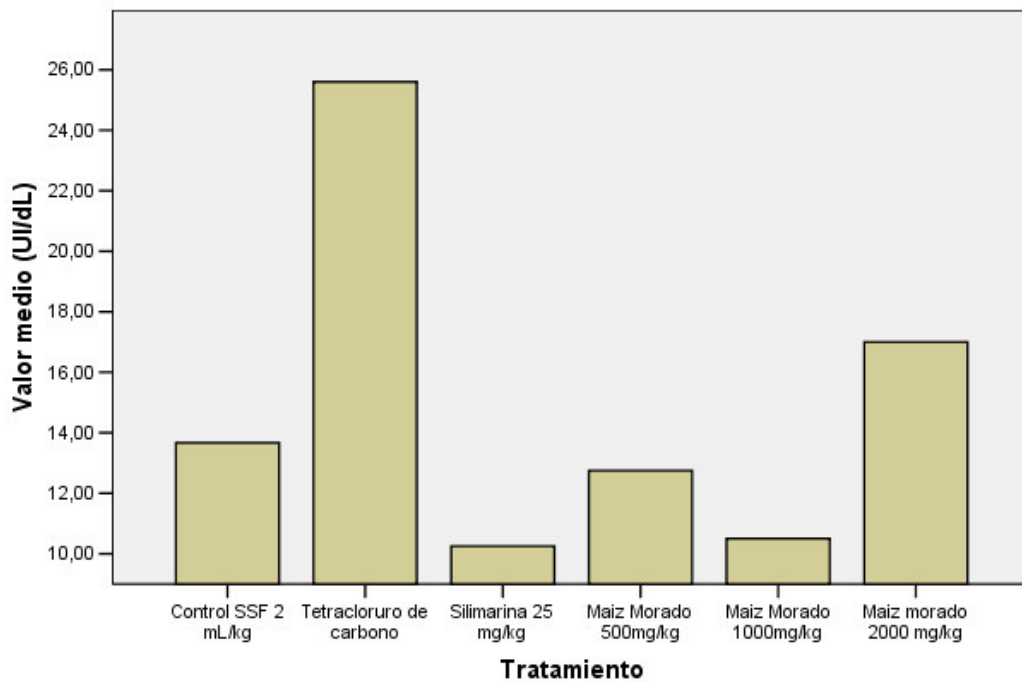


Figura 6. Niveles de TGP al evaluar el efecto protector hepatico en ratas.

Determinacion de marcador del stres oxidativo.

Muestra los valores de malondialdehido como marcador del stress oxidativo reducido hasta un 83% a una dosis de 1000mg/kg.

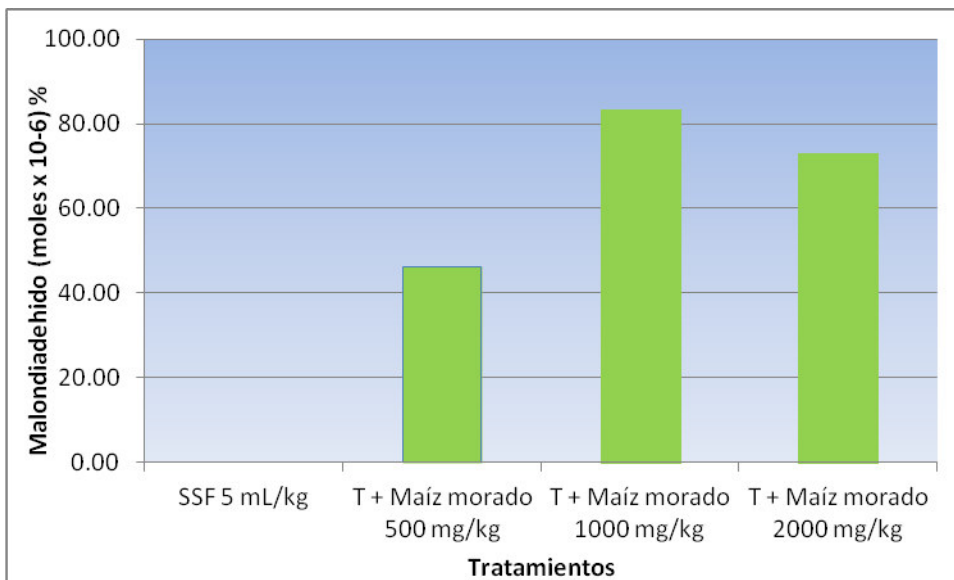


Figura 7. Porcentaje de varianción del malondialdehido en ratas con lesion hepatica inducida por tetracloruro de carbono y tratadas con *Zea mays L.*

HISTOLOGIA DEL DAÑO HEPATICO

Los resultados histológicos se clasificaran por 3 escalas de recuperación:

Leve: recuperación de más del 75%, moderado: recuperación del 50% y Severo recuperación de las del 25%, del tejido hepático.

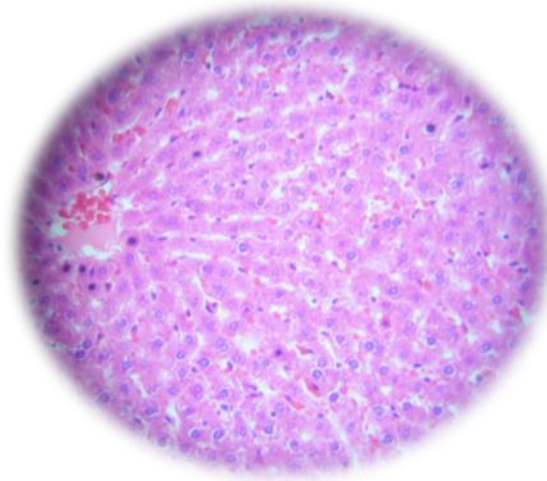


Figura 8. Observación del tejido hepático con las estructuras normales sin daño hepático, Hígado normal 400X.

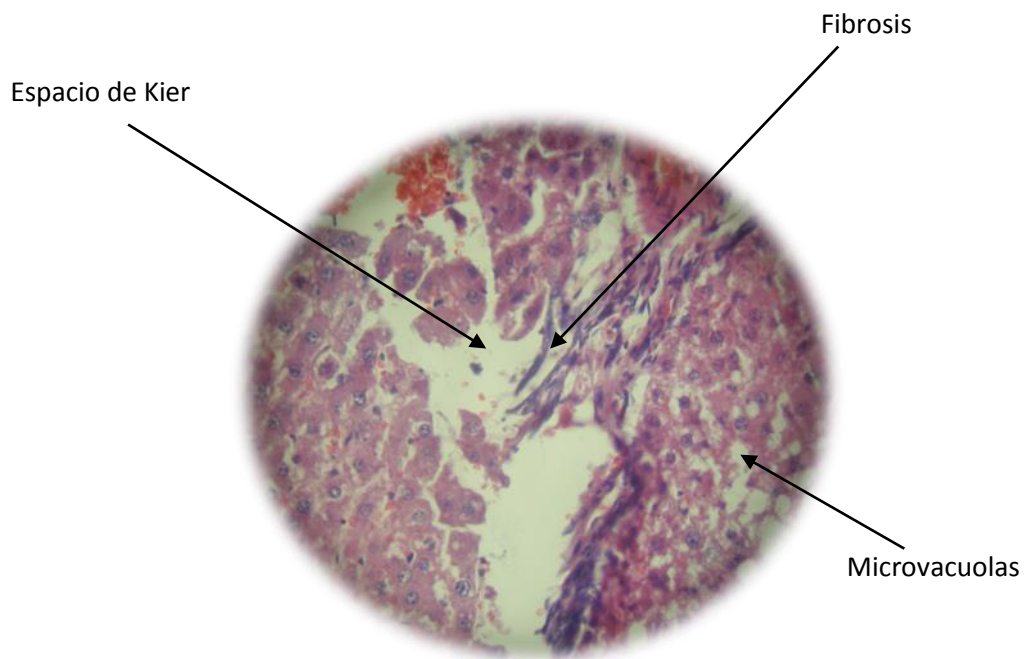


Figura 9. Observación del tejido hepático con la administración de CCL_4 presenta estructuras histológicas con daño hepático con alteraciones en formas de fibrosis habiendo variaciones de microvacuolas hasta adipocitos en el espacio de kier. 400X.

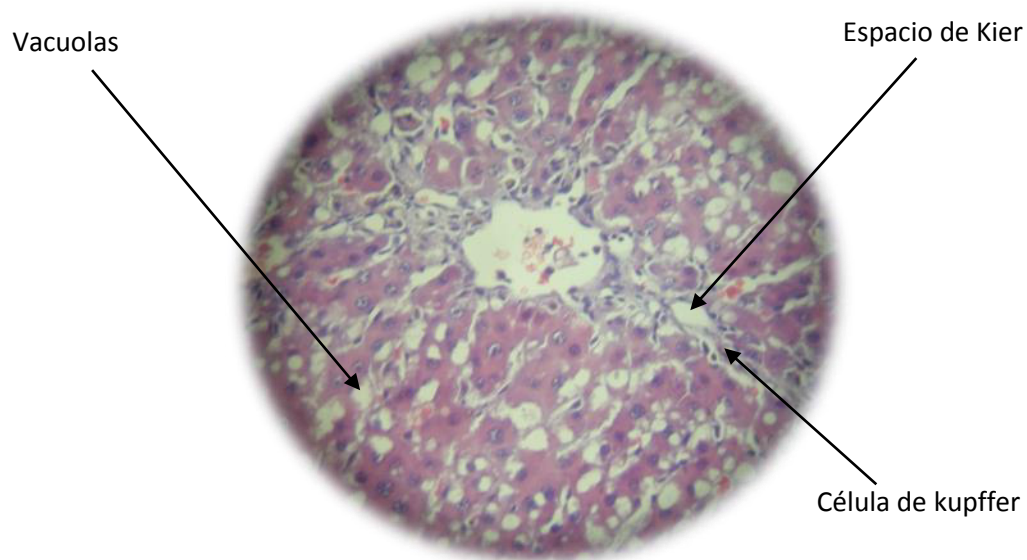


Figura 10. Administración de Silimarina observándose una mejoría en las estructuras de los hepatocitos con núcleo en cariólisis y cariorexis, e infiltraciones. (100X y 400X).

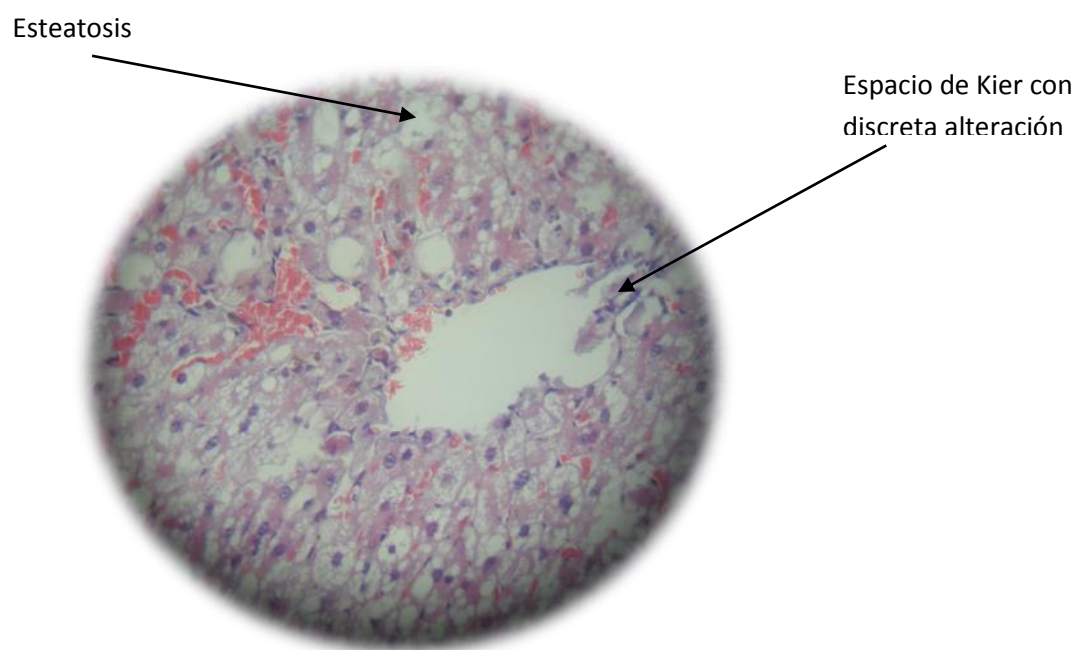


Figura 11. Administración del extracto hidroalcohólico atomizado a una dosis de 500 mg/kg. 400X. Observándose Esteatosis , reemplazo de células hepáticas por adipocitos, espacio de kier con discreta alteración.

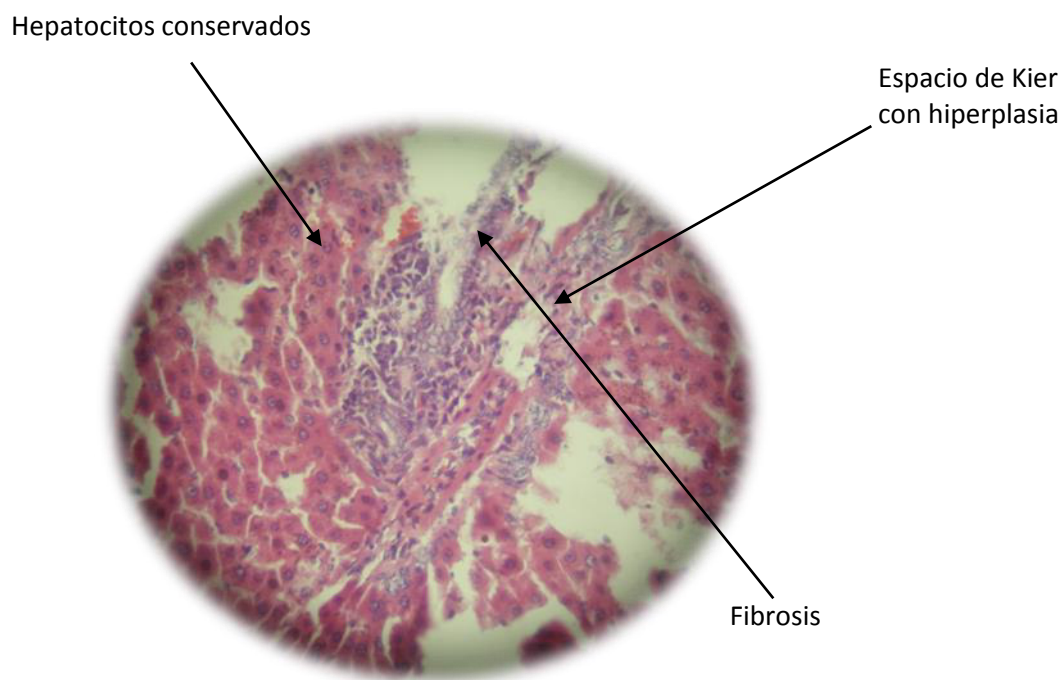


Figura 12. Administración del extracto hidroalcohólico atomizado a una dosis de 2000 mg/kg. Congestión en venas centrolubulillares, espacio de Kier con presencia de histiocitos y fibrocitos; células de Kupffer y macrófagos han fagocitado pigmentos oscuros; mayor de 50% de núcleos conservados. 400X.



Figura 13. Administración del extracto hidroalcohólico atomizado a una dosis de 1000 mg/kg. 400X. Hepatocitos conservados, con estructuras hepáticas conservadas. Hepatocitos con discreta pigmentación citoplasmáticas glandulares; 50% de núcleos conservados; espacio de kier con hipertrofia en la base de las células de Kupffer e histiocitos.

5.2. DISCUSION

Las lesiones hepáticas se explicaría porque el fenobarbital es un potente estimulante hepático que in vivo produce hipertrofia e hiperplasia a este nivel; del mismo modo, otros carcinógenos celulares frecuentemente son usados en este tipo de modelos experimentales. Asimismo, se ha comunicado que el tratamiento a largo plazo en ratas resulta en atrofia, disminución y pérdida de regeneración hepática (Hashimoto M, Kothary PC, Raper SE. 1999).

En cambio, el tetracloruro de carbono (CCl_4) se metaboliza activamente por el citocromo P450 al radical triclorometilo, el cual inicia la lipoperoxidación celular, produciendo daño hepático al comprometer la integridad de las membranas y por la unión covalente de intermediarios reactivos a moléculas biológicamente importantes, como el glutatión, induciendo necrosis y daño hepático en general (Wang GS, Eriksson LC, Xia L, Olsson J, Stål P. 1999; Aldaba-Muruato LR, Moreno MG, Shibayama M, Tsutsumi V, Muriel P. 2011).

Por ello, se considera al estrés oxidativo como el principal mecanismo molecular involucrado en la toxicidad por tetracloruro de carbono, el cual tiene rol importante para la inactivación de células Kupffer en la fibrosis hepática inicial inducida por este agente. La producción de radicales libres durante el desarrollo del daño hepático conduce a la disminución de la actividad de la superóxido dismutasa. En ratas con inducción de cirrosis por CCl_4 , se ha encontrado correlación inversa entre las enzimas antioxidantes y las puntuaciones patológicas y/o de peroxidación lipídica (Wang L, *et al.* 2006; Galisteo M, Suárez A, Montilla MP, Torres MI, Gil A, Navarro MC. 2006)

Se identificó la presencia de metabolitos secundarios, tales como aminácidos libres, taninos, alcaloides, compuestos fenólicos y flavonoides, siendo estos últimos los de mayor cantidad (Tabla 2). Es conocido que la mayoría de los flavonoides son poderosos antioxidantes y poseen diversas actividades antiinflamatorias; los flavonoides son inhibidores de la formación de leucotrieno B₄, potenciadores de la formación de prostaglandina E₂ e inhibidores de la liberación de óxido nítrico (López-Lirola, A. *et al.*, 2003).

Así como, actividad hepatoprotectora relacionada con la capacidad de estos de disminuir el estrés oxidativo y atrapar radicales libres, tanto in vivo como in vitro (Kim KH, *et al.* 2002; Perez RM, *et al.* 2011); un ejemplo es el caso de la quercetina, el cual ha demostrado ser efectivo contra el daño hepático en ratas con inducción de cirrosis

con tetracloruro de carbono, asociado con un incremento de la capacidad antioxidante del hígado para atrapar radicales peroxilo (Kwiecinski MR. 2011); y en ratas con obstrucción biliar crónica, el tratamiento con quercetina resultó en una preservación significativa de la actividad de las enzimas antioxidantes, fibrosis menos pronunciada y marcada inhibición de la proliferación ductular biliar (Pavanato A. 2003;Peres W. 2000).

En el presente trabajo se ha demostrado la reducción del marcador del stress oxidativo (malondialhído) como se observa en la figura 7, como indicador del efecto antioxidante encontrada se justifica posiblemente por la presencia de compuestos fenólicos (Arroyo J. 2007; Salgado L. 2000), como lo expresan (Gorinstein et al. 2005) encontraron un incremento de la actividad antioxidante del plasma en ratas que reciben compuestos fenólicos, resultados muy semejantes a los que obtuvimos con el extracto hidroalcohólico atomizado de *Zea mays L.* Otros autores también encontraron una potente actividad antioxidante de los compuestos fenólicos contenidos en diversas plantas medicinales como el tamarindo (Sudjaroen Y, 2005), uña de gato (Gonçalves C, 2005).

Se ha evidenciado una reducción del 73% de MDA a una dosis de 2000mg/kg, 83% a dosis de 1000mg/Kg y 46% a dosis de 500mg/kg como indicador del marcador de stress oxidativo como se muestra en la Fig. 7. Al evaluar diferentes marcadores bioquímicos no hubo diferencia significativa entre los grupos de tratamiento que recibieron tanto el tóxico como la silimarina y las diferentes dosis del extracto acuoso atomizado de maíz morado, sin embargo, sí hubo diferencia en el peso corporal (Figura 1); en los animales con lesiones hepáticas fue significativamente menor comparado con los animales del grupo control y los otros grupos de tratamiento que recibieron el extracto de maíz morado, mostrando una disminución en la ganancia de peso corporal causado por la administración del tóxico; este efecto podría estar asociado a alteraciones en la absorción de nutrientes y la utilización metabólica (Galisteo M, et al. 2006)

Las antocianinas son los elementos más reconocido del grupo de los flavonoides. Bell et al. (Bell D, 2006) ha demostrado ser un potente antioxidante y un capturador excepcionalmente potente de radicales libres de oxígeno, los cuales tienen un rol crítico en la patogénesis de la enfermedad hepática.

Estos hallazgos se complementan bien con la buena tasa de absorción y biodisponibilidad tanto en ratas como en humanos, que tienen las antocianinas

presentes en el *Zea mays L* ; en especial la cianidina 3 glicósido, la cual, tras ser administrada por vía oral, es incorporada a la circulación manteniendo su estructura química intacta. A pesar de ello, es necesario recalcar que los resultados obtenidos C. Aún falta determinar la farmacocinética de estos compuestos, su toxicidad, relevancia clínica y limitaciones; así como determinar si el consumo tradicional de la “chicha morada” en nuestro medio, llega a ser un factor de protección de la salud pública. (Andlauer W, 2003).

En este estudio, el extracto hidroalcohólico atomizado de maíz morado se comparó con la silimarina, que es un flavonoide antioxidante aislado del cardo mariano (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) y se utiliza clínicamente como un desintoxicante del hígado y hepatoprotector. Varios estudios recientes han demostrado efectos anticancerígenos de la silimarina (Polyak SJ, et al. 2010; Cho YK, et al. 2009)

Con respecto al dosaje de enzimas hepáticas y proteínas totales, los niveles séricos de transaminasas glutámico pirúvica (TGP) y transaminasas glutámico oxalacética (TGO) en las ratas sin insuficiencia hepática, se encuentran en el límite superior de los valores normales (Figura 6), y en las ratas con insuficiencia hepática, se encuentran incrementados, esto ocurre con sustancias como la D-galactosamina que induce insuficiencia hepática (Maezono K, et al. 1996).

En la figura 9 se evidencia incremento en la fibrosis, en el colágeno, y por tanto el daño hepático; la fibrosis hepática es la consecuencia común a lesiones hepáticas crónicas de muchas etiologías. El abuso crónico de alcohol es el principal motivo de que aparezca fibrosis hepática, lo que conduce a la cirrosis, una de las principales causas de muerte en todo el mundo. La fibrosis se caracteriza por una acumulación excesiva de proteínas de matriz extracelular (MEC), tal como el colágeno de tipo I (encontrado en humanos), que se encuentran normalmente en la zona pericentral y perisinusoidal del hígado (Vera M, Nieto N. 2006). Como se conoce, existen tres tipos de moléculas: a) colágenos; b) glicoproteínas (fibronectina, laminina); y, c) proteoglicanos (Greenwel P, et al. 1994; Greenwel P, Rojkind M. 2001). En la fibrosis hepática destacan por su importancia los colágenos de los tipos I y III.

Se conoce que la silimarina es un compuesto de cuatro isómeros flavonolignan, conocidos como silibina, isosilibina, silidianina y silicristina. El isómero silibina es el componente mayor y más activo, representando entre 60 y 70% del compuesto, seguido por silicristina (20%), silidianina (10%) e isosilibina (5%) (Saller R, Meier R, Brignoli R. 2001). Silipida es un compuesto de fosfatidilcolina de silibina el que

asegura la biodisponibilidad de silibina (Vailati A, et al. 1993). El tetracloruro de carbono induce incrementos de transaminasas y colágeno entre 4 a 5 veces más que el normal, mientras que la administración de CCL4 más silimarina disminuyó esas elevaciones significativamente, posiblemente al proteger la membrana celular del hepatocito, así evitaría el desequilibrio colesterol: fosfolípidos y esfingomielina: fosfatidilcolina, y también redujo los niveles de colágeno (Pradhan SC, Girish C. 2006).

CONCLUSIONES.

- El estudio fitoquímico del extracto hidroalcohólico atomizado del *Zea mays L.* variedad morado reveló la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en mayor cantidad.
- En las condiciones experimentales, se ha evidenciado que el extracto hidroalcohólico atomizado del maíz morado ejercen efecto protector en las lesiones hepáticas inducidas en ratas, comparativamente al efecto dado por silimarina.
- El posible mecanismo de acción del extracto hidroalcohólico atomizado del *Zea mays L.* variedad morado estaría dado por su efecto antioxidante al reducir el marcador del stress oxidativo (malondialdehído) en las ratas con inducción de lesión hepática.
- El estudio histológico ha demostrado reducción de la lesión hepática en ratas al administrar por vía oral el extracto hidroalcohólico atomizado de maíz morado.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aldaba-Muruato LR, Moreno MG, Shibayama M, Tsutsumi V, Muriel P. (2011). Protective effects of allopurinol against acute liver damage and cirrhosis induced by carbon tetrachloride: Modulation of NF- κ B, cytokine production and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta*. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030441651100239x>.
2. Alter M. (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol*; 13:2436-2441.
3. Andlauer W, Stumpf C, Frank K, Fürst P. (2003). Absorption and metabolism of anthocyanin cyanidin-3-glucoside in the isolated rat small intestine is not influenced by ethanol. *Eur J Nutr*.;42(4):217-33.
4. Arroyo J, Ráez E, Rodríguez M, Chumpitaz V, Burga J, De la Cruz W, et al. (2007). Reducción del colesterol y aumento de la capacidad antioxidante por el consumo crónico de maíz morado (*Zea mays* L) en ratas hipercolesterolémicas. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*; 24(2): 157-62.
5. Arroyo J, Rojas J. (2002). Investigación Farmacológica Preclínica y Clínica. Primera edición- Asdimor.
6. Aoki H, Kuze N, Kato Y. (2002). Anthocyanins isolated from purple corn (*Zea mays* L.). *Foods Food Ingred Jap*.
7. Balbín G, Cuera A, Vildósola H. (2006). Prevalencia de anticuerpos contra el virus de hepatitis C en pacientes con cirrosis hepática. *Rev. Gastroenterol. Perú*.
8. Bell DR, Gochenaur K. (2006). Direct vasoactive and vasoprotective properties of anthocyanin-rich extracts. *J Appl Physiol*; 100(4):1164-70.
9. Block G, Patterson B, Subar A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence, *Nutr Cancer*.
10. Bonavia D. (1991). Historia del maíz. *Acta Herediana*;12: 6-7,8-9,11-12.
11. Buege JA, Aust SD. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*;10.
12. Bustíos C, Dávalos M, Román R, Zumaeta E. (2006). Características Epidemiológicas y Clínicas de la Cirrosis Hepática en la Unidad de Hígado del HNERM Es-Salud.
13. Carhuapoma YM. (2006). Maíz Morado-moléculas bioactivas antioxidantes y anticancerígenas. Editorial e Imprenta de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

14. Cevallos BA, Cisneros ZL. (2003). Stoichiometric and kinetic studies of phenolic antioxidants from Andean purple corn and red-fleshed sweetpotato. J. Food Chem.
15. Cheeseman K, Slater T. (1993). An introduction to free radicals in medicine. Brit Med Bull.
16. Cho YK, Yun JW, Park JH, Kim HJ, Park DI, Sohn CI, Jeon WK, Kim BI, Jin W, Kwon YH, Shin MK, Yoo TM, Kang JH, Park CS. (2009). Deleterious effects of silymarin on the expression of genes controlling endothelial nitric oxide synthase activity in carbon tetrachloride-treated rat livers. Life Sci.;85(7-8):281-90.
17. Del Pozo ID, Brenes C, Serna SS, Stephen TT. (2006). Polyphenolic and antioxidant content of white and blue corn (*Zea mays* L.) Products Food Research International;39: 696-703.
18. Derteano C. (1980). El maíz en el Perú. Sociedad Nacional Agraria. Lima:7,9.
19. Galisteo M, Suárez A, Montilla MP, Torres MI, Gil A, Navarro MC. (2006). Protective effects of *Rosmarinus tomentosus* ethanol extract on thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. Phytomedicine;13(1-2):101-8.
20. Ganong W, Macphree S. fisiopatología Médica. (2007). Introducción a la medicina clínica. Editorial Manual Moderno. quinta edición: 413-423.
21. Galisteo M, Suárez A, Montilla MP, Torres MI, Gil A, Navarro MC. (2006). Protective effects of *Rosmarinus tomentosus* ethanol extract on thioacetamide-induced liver cirrhosis in rats. Phytomedicine;13(1-2):101-8.
22. Gisbert JA. (1998). Intoxicaciones por medicamentos: analgésicos y antitérmicos. En: Medicina Legal y Toxicología. Valencia. Editorial Saber. 5ª ed.:796.
23. Gonçalves C, Dinis T, Batista MT. (2005). Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. Phytochemistry; 66(1): 89-98.
24. Goodman MM, Brown WL, Sprague GF, Dudley JW. (1998). in Corn and Corn Improvement, eds Sprague G F, Dudley J W (Am. Soc. Agron./Crop Sci. Soc. Am./Soil Sci. Soc. Am. Madison, WI):33-79.
25. Gorinstein S, Leontowicz H, Leontowicz M, Drzewiecki J, Jastrzebski Z, Tapia MS, et al. (2005). Red Star Ruby (Sunrise) and blond qualities of Jaffa grapefruits and their influence on plasma lipid levels and plasma antioxidant activity in rats fed with cholesterol-containing and cholesterol-free diets. Life Sci.; 77(19): 2384-97.

26. Greenwel P, Geerts A, Ogata I, Solís-Herruzo JA, Rojkind M. (1994). Liver fibrosis. En: Arias IM, Boyer JL, Fausto N, Jakoby WB, Schachter D, Shafritz DA, editors. The Liver Biology and Pathology. 3rd ed. New York: Raven Press Ltd.;p. 1367-81.
27. Greenwel P, Rojkind M. (2001). The extracellular matrix of the liver. En: Arias IM, Boyer JL, Chisari FV, Fausto N, Schachter D, Shafritz DA, editors. The Liver: Biology and Pathobiology. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins;469-73.
28. Guyton A. (2006). Tratado de fisiología médica. Novena edición. Mc Graw-Hill Interamericana. México. Pag.;992-994.
29. Halliwell B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). Free Radic Res.
30. Hashimoto M, Kothary PC, Raper SE. (1999). Phenobarbital in comparison with carbon tetrachloride and phenobarbital-induced cirrhosis in rat liver regeneration. J Surg Res.;81(2):164-9.
31. Kim KH, Kim YH, Lee KR. (2002). Isolation of quinic acid derivatives and flavonoids from the aerial parts of *Lactuca indica* L. and their hepatoprotective activity in vitro. Bioorg Med Chem Lett;17(24):6739-43.
32. Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins, Phytochemistry;64:923-933.
33. Kwiecinski MR, Felipe KB, Correia JF, Ferreira EA, Rossi MH, de Moura Gatti F, Filho DW, Pedrosa RC. (2011). Brazilian *Bidens pilosa* Linné yields fraction containing quercetin-derived flavonoid with free radical scavenger activity and hepatoprotective effects. Libyan J Med.;6 . doi: 10.3402/ljm.v6i0.5651.
34. Lesson I, Díaz GY. (1995). Summers JD. Poultry metabolic disorders and mycotoxins. Ed. University Books.
35. Levy M, Koeppen B, Stanton B. (2006). Fisiología. Editorial Mosby. Cuarta Edición. 2006:447-448.
36. Liberman S. (2007). The antioxidant power of purple cor. Research review. Alternative & complementary therapies;13:107-109.
37. Lock Olga. (2007). Colorantes Naturales. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. 1era Edición; 208.
38. López-Lirola A, González-Reimers E, Martín Olivera R, Santolaria-Fernández F, Galindo-Martín L, AbreuGonzález P, *et al.* (2003). Protein deficiency and muscle damage in carbon tetrachloride induced liver cirrhosis. Food Chem Toxicol;41(12):1789-97.

39. Maezono K, Mawatari K, Kajiwara K, Shinkai A, Maki T. (1996). Effect of alanine on D-galactosamine - induced acute liver failure in rats. *Hepatology*; 24(5): 1211-6.
40. Martín-Sanz P, Cascales M. (1990). Metabolismo de fármacos en hígado y sus alteraciones. En: Cascales M y col. *Hepatología*. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
41. Moreno L, Herrera A, Oyola L, Arroyo JL, Marrufo L. (2003). Metabolismo de hidrato de cloral en ratas con insuficiencia hepática inducida por tetracloruro de carbono. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*.
42. Moreno O, Paz-Aliaga A. (2010). Efecto vasodilatador mediado por óxido nítrico del Extracto hidroalcohólico de *zea mays* l. (maíz morado) en Anillos aórticos de rata. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*; 27(4): 527-31.
43. Ostapowicz G, Fontana RJ, Schiødt F. (2002). Acute Liver Failure Study Group. Results of a prospective study of acute liver failure at 17 tertiary care centers in the United States. *Ann Intern Med*.
44. Pavanato A, Tuñón MJ, Sánchez-Campos S, Marroni CA, Llesuy S, González-Gallego J, Marroni N. (2003). Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Dig Dis Sci*;48(4):824-9.
45. Pedreschi R, Cisneros-Zevallos L. (2006). Antimutagenic and antioxidant properties of phenolic fractions from Andean purple corn (*Zea mays* L.). *J Agric Food Chem*.
46. Peres W, Tuñón MJ, Collado PS, Herrmann S, Marroni N, González-Gallego J. (2000). The flavonoid quercetin ameliorates liver damage in rats with biliary obstruction. *J Hepatol*;33(5):742-50
47. Perez Gutierrez RM, Anaya Sosa I, Hoyo Vadillo C, Victoria TC. (2011). Effect of flavonoids from *Prosthechea michuacana* on carbon tetrachloride induced acute hepatotoxicity in mice. *Pharm Biol*;49(11):1121-7.
48. Polson J, Lee W. (2005). American Association for the Study of Liver Disease. AASLD position paper: the management of acute liver failure.
49. Polyak SJ, Morishima C, Lohmann V, Pal S, Lee DY, Liu Y, Graf TN, Oberlies NH. (2010). Identification of hepatoprotective flavonolignans from silymarin. *Proc Natl Acad Sci U S A*;107(13):5995-9.
50. Poynard T, Bedossa P, Opolon P. (1997). Natural history of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis C. The OBSVIRC, METAVIR, CLINIVIR, and DOSVIRC groups. *Lancet*.

51. Poynard T, Ratzu V, Charlotte F, Goodman Z, Mc Hutchison J, Albrecht J. (2001). Rates and risk factors of liver fibrosis progression in patients with chronic hepatitis.
52. Pradhan SC, Girish C. (2006). Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res.*;124(5):491-504.
53. Reddy MK, Alexander-Lindo RL, Nair MG. (2005). Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. *J Agric Food Chem.*
54. Requis F. (2007). Maíz INIA 615 - Negro Canaán. Nueva variedad de maíz morado para la sierra peruana. Estación Experimental Agraria Canaán-Ayacucho. Huamanga.
55. Salgado J, Tengan E. (2000). Determinación de compuestos fenólicos en estilos, estigmas, estambres y brácteas en la especie vegetal *Zea mays* L variedad morada. (Tesis). Lima-Perú. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional Mayor de San Marcos: 2-3.
56. Salgado J, Tengan E. (2000). Determinación de compuestos fenólicos en estilos, estigmas, estambres y brácteas en la especie vegetal *Zea mays* L variedad morada. Tesis para optar título profesional de Químico Farmacéutico. Lima: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
57. Saller R, Meier R, Brignoli R. (2001). The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs.*; 61:2035-63.
58. Samudram P, Rajeshwari H, Vasuki R, Geetha A, Sathya P. (2008). Hepatoprotective activity of Bi - herbal ethanolic extract on CCl₄ induced hepatic damage in rats.
59. Sudjaroen Y, Haubner R, Würtele G, Hull WE, Erben G, Spiegelhalder B, et al. (2005). Isolation and structure elucidation of phenolic antioxidants from Tamarind (*Tamarindus indica* L.) seeds and pericarp. *Food Chem Toxicol*; 43(11): 1673-82.
60. Sumano O. (2007). *Farmacología Veterinaria*. Editorial McGraw-hill interamericana. Segunda Edición.
61. Tovar O. (1993). Las gramíneas (Poaceae) del Perú. Monografía publicada por el Real Jardín Botánico.
62. Troncoso L. (1996). Efecto del ascorbato sobre la ruptura de los puentes disulfuro. Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Nutrición. Lima: Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

63. Vailati A, Aristia L, Sozze E, Milani F, Inglese V, Galenda P, et al. (1993). Randomized open study of the dose-effect relationship of a short course of IdB 1016 in patients with viral or alcoholic hepatitis. *Fitoterapia*;64:219-31.
64. Vera M, Nieto N. (2006). Células estrelladas hepáticas y hepatopatía alcohólica. *Rev Esp Enferm Dig.*; 98(9): 674-684.
65. Wang GS, Eriksson LC, xia L, Olsson J, Stål P. (1999). Dietary iron overload inhibits carbon tetrachloride-induced promotion in chemical hepatocarcinogenesis: effects on cell proliferation, apoptosis, and antioxidation. *J Hepatol*;30(4):689-98.
66. Wang L, Cheng D, Wang H, Di L, Zhou x, xu T, Yang x, Liu Y. (2006). The hepatoprotective and antifibrotic effects of *Saururus chinensis* against carbon tetrachloride induced hepatic fibrosis in rats. *J Ethnopharmacol.*;126(3):487-91.
67. Wolf D. (2010). Cirrhosis. *emedicine* [internet]. Consultado 2010 Nov 21. Disponible en: <http://emedicine.medscape.com/article/185856-overview>.
68. Yu BP. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews.*; 74(1):139-62.

ANEXO

Tabla 3. Cuantificación del malondialdehído en sangre en ratas con inducción de lesión hepática.

Tratamientos	Porcentaje de Variacion	Desviacion Estandar	Error Estandar	Intervalo de confianza a 95%	Valor Minimo	Valor Maximo	Valor Medio
SSF 5 mL/kg	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
T + Maíz morado 500 mg/kg	46.20	4.53	1.85	-0.40	1.46	13.15	4.35
T + Maíz morado 1000 mg/kg	83.21	2.93	1.20	1.39	2.54	10.12	4.47
T + Maíz morado 2000 mg/kg	73.03	2.33	0.95	2.38	2.65	8.27	4.83
Total		4.59	0.84	2.63	0.00	18.08	4.35